

果蝇抗微生物肽基因的免疫诱导模式

邓小娟¹ 杨婉莹¹ 李怡峰² 王文献² 温硕洋² 夏庆友³ 曹 阳^{1,*}

(1. 华南农业大学动物科学学院蚕丝科学系, 广州 510642; 2. 华南农业大学资源环境学院昆虫学系, 广州 510642;
3. 西南大学蚕学与生物技术学院, 农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 400716)

摘要: 果蝇作为一种模式昆虫, 为研究昆虫和人类的先天免疫发挥了重要作用。目前对果蝇体内免疫诱导产生的抗微生物肽多基因家族在分子进化、抗菌功能的分子特征和免疫诱导表达的信号传递机制等方面的研究进展, 进一步加深了人们对昆虫乃至其他动物和人类先天免疫模式的认识, 为研究其他昆虫特别是作为主要农林害虫的鳞翅目昆虫的先天免疫机制发挥了重要作用。本文集中对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 抗微生物肽及其免疫模式的研究结果和最新进展进行了介绍, 其中包括作者近几年的研究结果。

关键词: 果蝇; 抗微生物肽; 多基因家族; 免疫

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)04-0405-11

Induction pattern of antimicrobial peptides genes in *Drosophila*

DENG Xiao-Juan¹, YANG Wan-Ying¹, LI Yi-Feng², WANG Wen-Xian², WEN Shuo-Yang², XIA Qing-You³, CAO Yang^{1,*} (1. Department of Sericulture Science, College of Animal Science, South China of Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Department of Entomology, College of Natural Resource and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Key Sericultural Laboratory of Agriculture Ministry, College of Sericulture and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: *Drosophila melanogaster* is an attractive model insect for dissecting the innate immunity system of invertebrates and vertebrates. The fruitful results on several aspects of antimicrobial peptides (AMPs), such as cloning and characterization of AMP genes, the signal transduction path way and the evolution of the AMPs multi-gene families in *Drosophila* species, have contributed a lot to the deep understanding of the innate immunity mechanism of insects and other organisms. Such results may also shed further light on the mechanism of immunity of some agricultural lepidopteran pest insects and the strategies of pest control. In this review, we summarized the structures, biological properties, the induction pattern, the signal transduction pathway, as well as the evolution of AMPs and their multi-gene families.

Key words: *Drosophila*; antimicrobial peptides; multi-gene family; immunity

昆虫具有极强的适应能力和防御能力, 在地球上广为分布。昆虫的幼虫能在腐烂潮湿的环境中生长, 而成虫通常成为传播微生物(包括动植物病原微生物)的载体, 这主要是因为昆虫具有强大的先天免疫系统。昆虫的先天免疫, 或称天然免疫, 包括细胞免疫(cell immunity)和体液免疫(humoral immunity)。当外来物突破昆虫第一道由外表皮组成的物理防线后, 就可激活体内产生一系列的应答, 包括血细胞的

包围、吞噬及伴随的黑化反应(称之为细胞免疫), 以及抗微生物肽(antimicrobial peptides, AMPs)的合成和分泌(称之为体液免疫)(Khush and Lemaitre, 2000)。

果蝇作为一种重要的模式生物, 为研究昆虫和人类的天然免疫起了重要作用。目前在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 体内已发现了 Attacin(柞蚕素)、Cecropin(天蚕素)、Defensin(防御素)、Drosomycin

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目(2005CB121000); 国家自然科学基金项目(30370716); 广东省自然科学基金项目(010294, 032256, 04020553); 广东省科学技术计划重点项目(2003C104042)

作者简介: 邓小娟, 女, 1973年生, 浙江人, 硕士, 讲师, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: dengxj@scau.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: caoyang@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2006-09-12; 接受日期 Accepted: 2006-12-16

(果蝇抗真菌肽) λ Dorsocin(果蝇肽) λ Diptericin(双翅肽)和 Metchnikowin(碧螬金属肽) λ Lemaitre *et al.*, 1997; Hoffmann, 2003)及在雄性果蝇的射精囊中特异表达的 Andropin(Samakovlis *et al.*, 1991; Date *et al.*, 2002)共 8 种抗微生物肽。不同种类的抗微生物肽,分子结构不同,抗菌谱和抗菌机制也不同。Drosomycin 只对丝状真菌有作用(Fehlbaum *et al.*, 1994), Metchnikowin 对细菌和真菌都有抗性(Levashina *et al.*, 1995), Attacin、Dorsocin 和 Diptericin 主要对革兰氏阴性菌起作用(Bulet *et al.*, 1995),而 Defensin 主要对革兰氏阳性菌起作用(Dimarq *et al.*, 1994);Cecropin 主要对革兰氏阴性菌起作用(Kylsten *et al.*, 1990),对革兰氏阳性菌和真菌也有活性(Ekengren and Hultmark, 1999);与 Cecropin 有共同起源的 Andropin 则通过交配诱导后表达,能抑制精液中特殊的微生物(Samakovlis *et al.*, 1991; Date *et al.*, 2002)。不同种类的抗微生物肽组成了一个严密的防御网络,以抵御不同发育阶段的各种不同微生物的侵染。

近 10 年来,关于昆虫抗微生物肽抗菌活性的分子结构特征,特别是免疫诱导表达的信号传递模式,取得了许多重要进展,这些进展主要是基于对果蝇抗微生物肽的研究结果。本文综述介绍黑腹果蝇抗微生物肽同系物基因的定位分布、分子进化、抗菌功能的分子特征和免疫诱导表达的信号传导模式等方面的研究进展。

1 基因定位与分子进化

Adams 等(2000)完成了对黑腹果蝇基因组的全测序后,对在黑腹果蝇中已发现的 8 类抗微生物肽基因 *drosomycin*、*attacin*、*cecropin*、*diptericin*、*defensin*、*dorsocin*、*metchnikowin* 和 *andropin* 在基因组中进行定位和进化分析成为可能。Jiggins 和 Kim(2005)基于

此对目前已在果蝇中(包括黑腹果蝇)发现的各种抗真菌肽(antifungal peptide)的分子进化进行了综述。

图 1 为黑腹果蝇 8 种抗微生物肽基因在基因组中的定位分布。由图 1 可以看出 Andropin、Defensin、Dorsocin 和 Metchnikowin 在基因组中只有单一的基因拷贝,而 Drosomycin、Attacin、Cecropin 和 Diptericin 则分别存在多个在氨基酸序列上具有较高同源性和相同保守位点的同系物(isoforms)基因(表 1)。编码这些同系物的基因家族被称之为“多基因家族”(multi-gene family)(Clark and Wang, 1997; Date *et al.*, 1998; Ramos-Onsins and Aguade, 1998; Quesada *et al.*, 2005)。在黑腹果蝇基因组中,Attacin 和 Cecropin 多基因家族分别有 4 个成员,Diptericin 为 2 个,对它们的序列特征和进化分析已有较多的研究(Clark and Wang, 1997; Date *et al.*, 1998; Ramos-Onsins and Aguade, 1998; Dushay *et al.*, 2000; Hedengren *et al.*, 2000; Lazzaro and Clark, 2001; Quesada *et al.*, 2005)。但是对 Drosomycin 7 个同系物的多基因家族成员(Adams *et al.*, 2000; Khush and Lemaitre, 2000),直到 2005 年 Jiggins 和 Kim 才报道了对包括黑腹果蝇在内的和在 *D. yakuba*、*D. simulans*、*D. ananassae* 等其他几种果蝇中发现的 Drosomycin 基因的分子突变分析和进化树的构建(Jiggins and Kim 2005)。

对黑腹果蝇 Drosomycin (*Drs*)同系物多基因家族成员的称谓,目前有 2 套暂时性的命名。Fehlbaum 等(1994)最先鉴定到 Drosomycin 时,将其基因命名为 *drs* (*Drs*)。此后 Cao 等(2003a, 2003b, 2003c, 2003d, 2003e, 2003f)根据已在 *D. triauraria* 鉴定到 *Drosomycin-like A/B* 基因(Daibo *et al.*, 2001)的情况,将 Adams 等(2000)在 GenBank 上登录的另外 6 个 *drs* 的同系物分别命名为 *Drs-1C* (AY225091)、*Drs-1D* (AY351397)、*Drs-1E* (AY351398)、*Drs-1F* (AY351399)、*Drs-1G* (AY351400) 和 *Drs-1I*

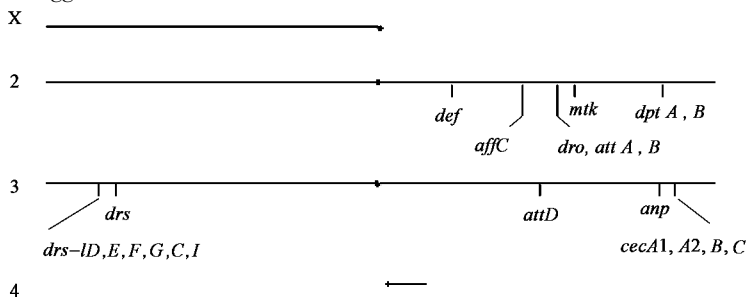


图 1 黑腹果蝇抗微生物肽基因在染色体上的定位分布

Fig. 1 Map of the genes for antimicrobial peptides on the chromosomes in *Drosophila melanogaster*

(AY351402),它们分别相当于稍早时在 GenBank 上登录命名的 *Dro1* , *Dro2* , *Dro3* , *Dro4* , *Dro5* 和 *Dro6* (Jiggins and Kim , 2005)。 Yang 等(2006)在研究这些同系物的功能分化时 ,再一次把这几个同系物基因

按 Cao 等(2003a , 2003b , 2003c , 2003d , 2003e , 2003f)的命名确认为 *Drs-1C*、*Drs-1D*、*Drs-1E*、*Drs-1F*、*Drs-1G* 和 *Drs-1I*。

表 1 在黑腹果蝇中已发现的抗微生物肽种类及存在的同系物基因

Table 1 Antimicrobial peptides and their isoform genes in *Drosophila melanogaster*

抗微生物肽家族 Antimicrobial peptides family	同系物基因 Isoform genes	GenBank 登录号 GenBank accession no.	产物编号 Code of protein product	所在染色体臂： 细胞学定位 Chromosome arm： cytological position	氨基酸个数 Number of amino acid
Attacins	<i>attA</i>	NM 079021	CG10146	2R：51C1	221
	<i>attB</i>	NM 079022	CG18372	2R：51C1	228
	<i>attC</i>	NM 079005	CG4740	2R：50A3	222
	<i>attD</i>	NM 079667	CG7629	3R：90B6	181
Cecropins	<i>cecA1</i>	NM 079849	CG1365	3R：99E2	63
	<i>cecA2</i>	NM 079850	CG1367	3R：99E2	63
	<i>cecB</i>	NM 079851	CG1878	3R：99E2	63
	<i>cecC</i>	NM 079852	CG1373	3R：99E2	63
Defensins	<i>def</i>	NM 078948	CG1385	2R：46D9	92
Drosocins	<i>dro</i>	NM 079020	CG10816	2R：51C1	19
Drosomycins	<i>Drs-1D</i>	AY351397	CG32279	3L：63D1	70
	<i>Drs-1E</i>	AY351398	CG32283	3L：63D1	71
	<i>Drs-1F</i>	AY351399	CG32282	3L：63D1	71
	<i>Drs-1G</i>	AY351400	CG10812	3L：63D1	69
	<i>Drs-1C</i>	AY225091	CG32274	3L：63D1	69
	<i>Drs-1I</i>	AY351402	CG32268	3L：63D1-D2	72
	<i>drs</i> (<i>Drs</i>)	NM 079177	CG10810	3L：63D2	70
Diptericins	<i>dpt</i> (<i>A</i>)	NM 057460	CG12763	2R：55F8	106
	<i>dptB</i>	NM 079063	CG10794	2R：55F8	120
Metchnikowins	<i>mtk</i>	NM 079028	CG8175	2R：52A1	26
Andropins	<i>anp</i>	NM 079848	CG1361	2R：99E2	57

果蝇的同一种抗微生物肽在基因组中存在多个同系物基因成员的现象,在其他昆虫中也普遍存在(肖业臣等, 2004),它们往往以基因簇的方式集中分布在基因组中的一至几个位置上,显示它们来源于一种动态中的稳定(dynamical steady-state)进化方式。在这种进化模式中,新的同系物基因不断地由基因重复而产生,另外一些基因则可能通过突变而丢失(Hedengren *et al.* , 2000)。对由复制(duplication)而来的基因的命运, Lynch 和 Conery (2000)作了 3 种假设:无功能化、新功能的获得和功能减弱化。然而,对这 3 种假设,目前还存在着争议。随着越来越多的实验对功能的验证(Yang *et al.* , 2006), Lynch 和 Conery (2000)对由复制而来的基因命运的假设可望得到进一步的补充和完善。

从图 1 也可以清楚地看出,黑腹果蝇的抗微生物肽基因在基因组中的定位分布也有这一特征,即

同一家族的同系物基因成员成簇集中分布,如 Drosomycin 的 7 个同系物基因集中位于 3L 染色体臂的 63D1-63D2 区,其他几个抗菌肽家族成员则成簇分布在 2R、3R 染色体臂的特定位置,提示它们可能是相邻位点发生基因重复的结果。这些重复基因处于同一遗传调控区域中,由于突变使其功能区域中的某些氨基酸残基改变,进而导致它们既具有相似的抗菌功能,但抗菌谱却发生了变化。我们的研究发现,黑腹果蝇 Drosomycin 家族的 7 个同系物基因具有抗真菌谱的差异(Yang *et al.* , 2006),便可以由此得到部分的解释。远距离分布的不同抗微生物肽基因家族则可能是由相同的古老基因发生不等交换,分开到相距甚远的遗传调控区域中,在选择压力下分歧进化为具有不同抗菌功能的基因家族。

上述观点是否可以在这些抗微生物肽家族之间的分子进化关系中找到某些依据呢?我们采用

Mega3 软件 ,用邻位相连法(Neighbor-Joining method , NJ 法)绘制了黑腹果蝇 8 种抗微生物肽家族成员的系统树(图 2)。从图 2 可以看出 :① 在该树中 , Defensin 与 Drosomycin 聚在一起 ,Drosomycin 与 Defensin 的分子组成极为相似 ,富含 Cys ,具有相似的三维分子结构 ,即由 Cys 形成的 3 ~ 4 对二硫键稳定它们的 α -螺旋和 β -折叠。② Andropin 和 Cecropin 不仅在基因组中的位置最近 ,而且结构与功能也相似 ,在此分子进化分析的系统树上也最为接近。

Date 等(2002)曾将 Andropin 归于 Cecropin 家族中 ,我们的分析结果再次印证了他们的观点。③Diptericin 和 Attacin 聚在一起 ,它们属于富含 Gly ,在功能上具有相似的抗菌活性 ,主要对增殖期的革兰氏阴性菌起作用。通过以上的分析 ,我们可以看出 ,抗微生物肽的分子特征、起源及其功能之间存在着一定的联系。具有相似分子特征并在树中聚在一起的抗菌肽可能具有相同的起源 ,而它们的分子分化以及功能的分化也是昆虫强大的先天免疫系统的基础。

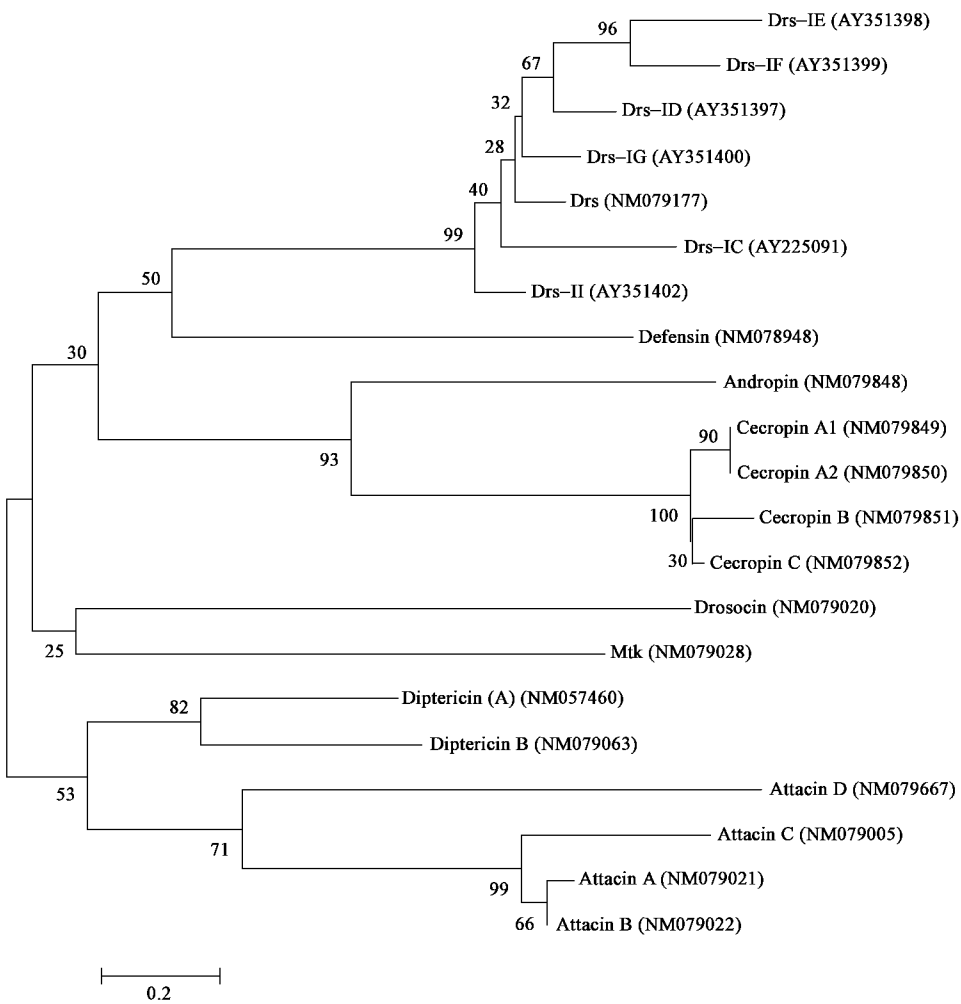


图 2 由氨基酸序列推导的黑腹果蝇抗微生物肽的 NJ 系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree based on the amino acid sequences of antimicrobial peptides in *Drosophila melanogaster* by Neighbor-Joining method

括号内编码为抗微生物肽基因的 GenBank 登录号 (The codes in brackets are GenBank accession numbers of antimicrobial genes).

2 抗菌功能的分子特征

如前所述 ,目前在黑腹果蝇体内发现的抗微生物肽种类有 8 种 ,这些抗微生物肽同系物家族成员

的分子结构与功能的关系以及它们的抗菌机理 ,一直是人们关注的问题 ,有关这方面的认识 ,有些是来源于对在其他昆虫中发现的同类抗微生物肽的研究结果。

2.1 Drosomycin

Drosomycin(Drs)是第 1 个被鉴定发现的昆虫抗真菌肽,只对丝状真菌有强抗性,对细菌和酵母不敏感(Fehlbauer *et al.* , 1994)。除在黑腹果蝇基因组中首先发现了 7 个 Drs 同系物家族成员和在 *D. triauraria* 鉴定到 Drs-like A/B 基因(Daibo *et al.* , 2001)外,近几年还在其他果蝇中发现了数目不等的 Drs 同系物家族成员,例如 *D. yakuba* 有 6 个、*D. simulans* 有 7 个、*D. ananassae* 有 4 个(Jiggins and Kim , 2005)。到目前为止,尚未见到果蝇属之外的昆虫存在 Drosomycin 的报道。

在黑腹果蝇中,Drs 家族的 7 个同系物基因均无内含子,编码的前肽为 69 ~ 72 个氨基酸,成熟肽为 44 或 46 个氨基酸,它们之间的相似性变幅较大(65% ~ 97%),但具有一些完全相同的氨基酸保守位点和 8 个 Cys 残基位点。在其他果蝇中发现的 Drs 族的不同系物成熟肽之间,分子内的 4 对二硫键桥的连接位置也相当保守。在黑腹果蝇的 7 个 Drs 同系物分子之间,除 Drs-II 外,其他 6 个分子内二硫键的连接位置均与 Drs 相同,为 Cys²-Cys⁴⁴、Cys¹¹-Cys³³、Cys¹⁹-Cys³⁹和 Cys²³-Cys⁴¹(Michaut *et al.* , 1996)。在 Drs 分子中,由这 8 个 Cys 形成的 4 对二硫桥使分子折叠形成 CS $\alpha\beta$ 基序(cysteine stabilized alpha beta motif)结构,即由 1 个 α -螺旋和 3 股缠绕扭曲的 β -折叠组成的 $\alpha\beta\beta\beta$ 三维排列($\alpha\beta\beta\beta$ three-dimensional arrangement)(Landon *et al.* , 1997)。这与昆虫防御素 Defensin 的 $\alpha\beta\beta$ 三维排列相比,Drs 多了 1 对连接第 1 个 Cys 和 C 端 Cys 的二硫键(Cys²-Cys⁴⁴),即多了一股 β -折叠结构(Bulet *et al.* , 1999)。因此 Drs 的分子结构非常紧凑,这可能是 Drs 抗蛋白酶的原因之一(Landon *et al.* , 1997)。

脊椎动物的 Defensins 抗真菌肽也有这种 $\alpha\beta\beta\beta$ 三维排列,由动物表皮腺可以分泌约 10 ~ 20 种不同的抗真菌肽分子,这些抗真菌肽分子在分子大小、序列组成和抗菌特性等方面有所不同,显示出一个热点突变的快速适应性进化,这种进化来源于多样化的选择压力(Duda *et al.* , 2002)。这种以 $\alpha\beta\beta\beta$ 三维排列为核心基序的抗微生物肽,在一种连续变化的正向选择压力下发生分歧进化(Morrison *et al.* , 2003 ; Semple *et al.* , 2003 ; Lynn *et al.* , 2004),即变化着的病原环境压力可能导致古老的抗微生物肽向着抗真菌肽功能发生多样化的进化(Jiggins and Kim , 2005)。

在黑腹果蝇以及在其他果蝇发现的数目不等的 Drs 家族同系物基因成员中,除了 Fehlbauer 等(1994)

在发现 Drs 基因时鉴定了它的抗真菌功能外,一直未见关于果蝇 Drs 家族其他同系物成员抗真菌功能鉴定的实验报道。Yang 等(2006)鉴定了黑腹果蝇的 Drs 及其 6 个同系物基因克隆表达产物的抗真菌活性,结果发现 Drs 对供试的长柄链格孢菌 *Alternaria longipe* 等 7 种植物病原真菌都有抑杀作用,Drs-IC 和 Drs-ID 的抗菌谱较宽,Drs-IG、Drs-IE 和 Drs-IF 的抗菌谱依次变窄,Drs-II 则对供试的几种真菌均没有活性。与 Drs 分子对照,分析它们的变异位点,发现在活性减弱的 Drs-IG、Drs-IE、Drs-IF 和 Drs-II 分子的 β -折叠中存在变异位点,而在抗性谱较广的 Drs-IC 和 Drs-ID 的 β -折叠中则没有变异位点,暗示在 β -折叠中的变异位点更大程度地影响着抗菌功能。另外,在 Drs-II α -螺旋外的第 29 位和 30 位之间插入了 Arg 和 Val 2 个变异位点,也对功能的变化有着较大的影响。由这些变异位点与其抗性差异的内在关系,可能暗示了 β -折叠内的氨基酸和 α -螺旋以外的其他氨基酸对它们的抗菌差异至关重要(Yang *et al.* , 2006),提示在黑腹果蝇 Drs 同系物家族的不同成员之间,抗性差异可能与它们的核心 CS $\alpha\beta$ 基序无关。

关于 Drs 的杀菌机理,研究报道的还不多。Fehlbauer 等(1994)发现 Drs 在高浓度下可抑制孢子的萌发,低浓度可抑制菌丝的生长,对灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 的作用导致部分菌丝裂解、菌丝胞质外流。作者等也观察到用 Drs 处理的真菌孢子外层和两端出现损伤,孢子内容物外泄,菌丝分枝体出现缢缩甚至断裂,表面布满瘤状沉淀物,其作用机制是否与 Cecropin 作用于细胞膜而导致膜穿孔的机理类似,还有待于进一步研究(未发表资料)。

2.2 Attacin

Attacin 最早在惜古比天蚕蛾 *Hyalophora cecropia* 的免疫血淋巴中发现(Hultmark *et al.* , 1983 ; Boman *et al.* , 1985)。在黑腹果蝇的基因组中,Attacin 家族具有 4 个同系物成员:Attacin A、B、C 和 D(表 1)。各同系物基因中分别含 1 ~ 2 个内含子,Attacin A、B、C 定位于 2R 染色体臂,Attacin D 位于 3R 染色体臂。它们编码的成熟肽分子量相对较大,由 190 个氨基酸组成,无 Cys 而富含 Gly,属于一类富含甘氨酸的多肽(Gly-rich peptide)。Attacin A 和 B 的氨基酸序列一致性高达 97%,与 C 比较有 70% 的氨基酸一致,而与 Attacin D 的氨基酸序列差异较大(Dushay *et al.* , 2000 ; Hedengren *et al.* , 2000 ; Lazzaro and Clark , 2001)。

Attacin 形成无规卷曲的结构,这种松散的结构

允许 Attacin 中的氨基酸进行不严格的替换。Attacin 主要抗革兰氏阴性菌,其抗菌机制是通过抑制大肠杆菌细胞外膜蛋白的合成,从而阻碍细胞分裂而导致细胞死亡(Carlsson *et al.*, 1991)。

2.3 Cecropin

Cecropin 为一类分子量约 4 kD 的碱性小肽,热稳定性好,抗菌谱广。在黑腹果蝇的基因组中,Cecropin 家族有 4 个同系物成员:CecA1、A2、B 和 C(表 1)均位于 3R 染色体臂 99E2 区,基因中有 1 个内含子。编码的前肽为 63 个氨基酸,成熟肽 40 个氨基酸,CecA1 与 A2 的氨基酸完全一致,CecB、C 与 CecA1/A2 的相似性也非常高(Kylsten *et al.*, 1990)。在黑腹果蝇基因组中,除上述 4 个有功能活性的 Cecropin 同系物基因外,还发现了 2 个假基因(pseudogenes) *CecΨ1* 和 *CecΨ2*,它们分别位于 CecA1 与 CecA2、CecA2 与 CecB 之间(Kylsten *et al.*, 1990; Clark and Wang, 1997; Ramos-Onsins and Aguade, 1998)。

果蝇 Cecropin 与惜古比天蚕 Cecropin 为同一抗微生物肽家族,具有相同的二级结构,Cecropin 分子在有机溶液中折叠形成 2 个 α -螺旋,N-端两亲性螺旋,C-端疏水性螺旋,之间有一个 Ala-Gly-Pro 的铰链结构,即:螺旋-铰链-螺旋(helix-bend-helix)的结构。两亲性的结构允许 Cecropin 分子结合到原核细胞的细胞膜中(Durell *et al.*, 1992),导致细胞膜上孔洞的形成,胞内阳离子外泄,最终细胞裂解死亡。以前报道 Cecropin 对革兰氏阴性菌、阳性菌有广谱的抗性,近几年的研究表明它们对真菌也有抗性(Lucca and Bland, 1997; Cavallarin *et al.*, 1998),其中包括对果蝇 Cecropin 抗真菌活性的研究报道(Ekengren and Hultmark, 1999)。

2.4 Diptericin

Diptericin 最早从新陆原绿蝇 *Phormia terranova* 分离,为一类糖基化的多肽。黑腹果蝇的基因组中存在 Diptericin 的 2 个同系物基因:*dpt(A)* 和 *dptB*,位于 2R 染色体臂 55F8 区,*dpt(A)* 基因内部没有内含子,编码 106 个氨基酸的多肽;*dptB* 有 1 个内含子,编码 120 个氨基酸的多肽。Diptericin 具有富含 Pro 的 N 端、富含 Gly 的 C 端,有 2 个糖基化的位点(Bulet *et al.*, 1995)。

Diptericin 只对细菌有抗性,目前对其抗菌机制尚不清楚。有实验证据揭示 Diptericin 可打破细菌细胞膜的完整性(Winans *et al.*, 1999)。Otvoš(2002)认为 Diptericin 不是通过形成膜孔洞的机制发挥作

用,而是与破坏靶细胞的代谢过程有关。

2.5 Defensin

昆虫 Defensin 是一类分子量为 4~6 kD 的阳离子多肽,分子内部由 6 个 Cys 形成 3 个二硫键,3 个二硫键的连接位置分别为 Cys1-Cys4、Cys2-Cys5 和 Cys3-Cys6,形成了由 1 个 α -螺旋和 2 个 β -折叠的 $\alpha\beta\beta$ 三维排列。在黑腹果蝇基因组中只有 1 条 Defensin 的基因序列,位于 2R 染色体臂的 46D9 区。编码的产物全长 92 个氨基酸,成熟肽为 40 个氨基酸,富含精氨酸而带正电荷(Dimarcq *et al.*, 1994)。

Defensin 可形成两亲性的 α -螺旋和 β -折叠片的混合二级结构,Defensin 的这种双亲 α -螺旋构象与 Cecropin 相似并且也带正电荷。因此认为 Defensin 作用机理与 Cecropin 类似,作用于细菌的细胞膜,导致细胞质膜的渗透障碍,胞内 K^+ 外泄,细胞内膜去极化,细胞质的 ATP 减少,最终抑制呼吸(Cociancish *et al.*, 1993)。作用过程大致如下:首先,Defensin 中带正电荷的 Arg 残基与靶细胞表面带负电的基团发生静电作用,几个二聚体或单体 Defensin 形成一个直径约为 25Å 的跨膜孔洞,造成跨膜电位而将 Defensin 的疏水部分拉到细胞膜内(Selsted and Ouellette, 1995; White *et al.*, 1995)。尽管杀菌机理与 Cecropin 类似,但 Defensin 的抗菌活性与 Cecropin 有很大的不同,Defensin 主要对革兰氏阳性菌起作用,只有少数昆虫的 Defensin 对革兰氏阴性菌和真菌也有作用(Hetru *et al.*, 1998),而 Cecropin 对革兰氏阴性菌的抗性比革兰氏阳性菌强,有些 Cecropin 对真菌也有作用。

2.6 Drosocin

Drosocin 是在黑腹果蝇中发现的一类富含 Pro 的多肽。在黑腹果蝇基因组中只有 1 条 *drosocin* 序列,无内含子(Charlet *et al.*, 1996),定位于 2R 染色体臂的 51C1 区(2R:10260853..10261044)。Drosocin 成熟肽分子量小,只有 19 个氨基酸,其氨基酸序列为 GKPRPYSPRPTSHPRPIRV,具有重复的 PRP 三肽片段,其中 T^{11} (Thr¹¹)易发生糖基化的翻译后修饰。在果蝇的免疫血淋巴中存在 T^{11} 不同糖基化修饰的 Drosocin,没有发现非糖基化的 Drosocin。糖基化修饰对完全的生物活性是必需的,人工合成的非糖基化的 Drosocin 保留部分活性(Bulet *et al.*, 1993),但糖基化修饰对生物活性的影响机制还不清楚。研究表明糖基化和非糖基化的 Drosocin 在水溶液中均呈无规卷曲构象,加入 5% 三氟乙醇(一种膜模拟溶剂)后产生一团团折叠的构象,主要呈转角形式

(Bulet *et al.*, 1996) 比较糖基化和非糖基化的 Drosocin 的结构,发现它们存在细微的差异 (McManus *et al.*, 1999) 糖基化导致肽骨架变直,然而通常认为糖基化是一种转角诱导剂 (Otvos, 2002)。

Drosocin 主要抗革兰氏阴性菌,对部分革兰氏阳性菌也有作用 (Bulet *et al.*, 1993)。Drosocin 杀菌作用与 Cecropin 和 Defensin 的快速作用方式不同,需要处理几个小时后产生作用, Drosocin 进入细胞,抑制分子伴侣 DnaK 的功能,达到杀菌的效果。D-对映体完全没有活性,说明肽与靶细胞间的反应机制包含立体特异性的识别作用 (Otvos, 2000, 2002),但还没有找到相应的受体。

2.7 Metchnikowin

Metchnikowin 是在果蝇中发现的另一类富含 Pro 的抗菌肽,对真菌和革兰氏阳性菌有活性 (Levashina *et al.*, 1995),但对其抗菌机制未见报道。在果蝇基因组中只有 1 条 *metchnikowin* 基因序列,位于 2R 染色体臂的 52A1 区,在基因组上的定位是 2R:10923739..10923894。*metchnikowin* 编码的成熟肽为 26 个氨基酸,Pro 的含量占 27%(7/26),具有强碱性和亲水性。

2.8 Andropin

Andropin 是在成熟雄性果蝇的射精囊中特异表达的抗菌肽,猜测它的功能是防止精液中细菌的滋生 (Samakovlis *et al.*, 1991)。在果蝇基因组中只有 1 个拷贝,位于 3R 染色体臂的 99E2 区,与 Cecropin 同系物相邻分布在 4 kb 范围内 (Kylsten *et al.*, 1990)。Andropin 编码 57 个氨基酸,其二级结构与 Cecropin 相似,N 端带正电荷,形成两亲性的 α -螺旋,因此猜测 Andropin 也是采用膜渗透的作用机制。Andropin 与 Cecropin 最为相近,可能是 Cecropin 进化而来的 (Date *et al.*, 1998)。

2.9 果蝇抗微生物肽的分类

目前在昆虫中发现的抗微生物肽种类繁多,命名和归类也比较混乱 (肖业臣等, 2004),我们认为 Bulet 等 (1999) 的分类比较合理。按照 Bulet 的分类方法,黑腹果蝇的抗微生物肽可归到下述 3 类中:一是含 Cys 的环肽,分子内由二硫键形成的发夹- β 片或 α 螺旋- β -折叠的混合结构,如 Drosomycin、Defensin;二是形成两亲性 α -螺旋的线性多肽,如 Cecropin 和 Andropin;三是富含 Pro 和 Gly 的多肽,如 Attacin、Diptericin、Metchnikowin 和 Drosocin。

3 果蝇抗微生物肽基因的表达调控

Lemaitre 等 (1997) 的研究发现,真菌可优先诱导黑腹果蝇体内 Drosomycin 抗真菌肽基因的表达,革兰氏阴性菌则可优先诱导抗细菌肽基因的表达。近几年的研究发现,不同微生物感染后,昆虫抗微生物肽基因的表达主要是受 Toll 和 Imd (immune deficiency) 两种信号传导途径的调控。在信号传导途径中,通过特定的转录因子与顺式调控元件的结合,激活下游抗微生物肽基因的表达。

3.1 顺式调控元件

通过对黑腹果蝇、家蚕 *Bombyx mori* 和惜古比天蚕蛾等昆虫的研究发现,不同昆虫抗微生物肽的转录调控序列相似,主要的顺式调控元件有 NF- κ B 样元件、GATA 基序等,它们存在于编码序列的 5'非翻译区。此外,还发现与核免疫调控密切相关的 IL-6 作用元件 (IL-6RE)、干扰素共同应答元件 (interferon consensus response element, ICRE) 等参与了昆虫抗微生物肽基因的表达调控。

Sun 等 (1991) 首先对所有已知序列的天蚕抗菌肽基因序列的上游区域进行了分析,发现除 Cecropin D 外,其他基因都含有一段与哺乳动物转录因子 NF- κ B 结合序列 (GGGRNNYYCC) 高度同源的序列,称之为 NF- κ B 样元件。后来在果蝇、家蚕等昆虫的抗微生物肽基因的上游找到了这类序列 (GGGRAYYYYY),它们的位置通常靠近 TATA 框,距转录起始位点数十至数百个核苷酸 (屠益增等, 1997)。GATA 基序也参与了抗微生物肽基因的表达调控,实验表明 GATA 元件直接参与了果蝇体内 Cecropin A1 的表达,并且一个完整的 GATA 位点对 Cecropin A1 的激活是必需的 (Kadalayil *et al.*, 1997)。

3.2 转录因子

既然果蝇等昆虫抗微生物肽的基因中存在 NF- κ B 样顺式作用元件,就应该存在相应的反式作用因子 (转录因子)。第一个纯化的反式作用因子是天蚕免疫应答因子 CIF (Cecropia immunoresponsive factor) (Sun and Faye, 1992),在果蝇中发现的转录因子主要是 Rel 蛋白家族,Rel 蛋白与哺乳动物中的转录激活因子 NF- κ B 类似 (Khush *et al.*, 2001)。目前已发现的 Rel 蛋白主要有 Dorsal、Dif、Dorsal B 和 Relish 等。

最早确定的昆虫 Rel 家族成员是果蝇的背侧蛋

白 Dorsal ,它在胚胎早期的发育中决定背腹极性的发育(Lemaître *et al.* , 1996)。 Dif (Dorsal-like immune factor)和 Dorsal 十分相似 ,均含有结合 DNA 的 REL 同源区和核定位信号 ,只是在与 DNA 的结合位点上稍有不同(段云等 , 2004)。 Dif 和 Dorsal 主要参与抗真菌肽基因 *Drs* 的表达。研究表明在不同的发育阶段 , Dif 和 Dorsal 所起的作用有所不同 ,如在幼虫期 Dif 和 Dorsal 均能极大地提高 *Drs* 的表达 ,而在成虫期 Dif 是主要的调节因子(Meng *et al.* , 1999 ; Manfrulli *et al.* , 1999)。另一个 Rel 蛋白——Relish 主要参与抗细菌肽(如 Diptericin)基因的表达 , Relish 突变体对细菌感染表现敏感(Hedengren *et al.* , 1999)。

3.3 信号传导途径

不同的微生物感染黑腹果蝇后 ,可诱导产生不同的抗微生物肽 ,革兰氏阴性菌激活抗细菌肽的表达 ,而革兰氏阳性菌和真菌激活抗真菌肽的表达(Lemaître *et al.* , 1997)。已有的研究表明 ,它们的诱导表达至少受到 2 种信号转导途径的控制 ,即 Toll 途径和 Imd 途径。

对果蝇 Toll 途径和 Imd 途径的调控机制已经比较清楚 ,这 2 个信号途径与哺乳动物的先天免疫防御的 TLR 和 TNFR 信号途径极其相似(图 3) ,都是通过激活下游的 NF- κ B 样转录因子 ,调控免疫相关基因的转录。这 2 个途径的基因在结构和功能上都比较保守(Khush *et al.* , 2001)。

Toll 受体是在果蝇中发现的一种跨膜受体 ,具有膜外典型的亮氨酸富集区和膜内 TIR 结构域。经丝氨酸蛋白酶级联反应活化的配体 spätzle 与 Toll 受体膜外结构域结合产生活性 ,激活胞内 Tube、Pelle 等信号分子。Toll 信号途径的结果就是使 I κ B 样蛋白 Cactus 磷酸化 ,释放 NF- κ B 样 Dif 和 Dorsal 转录因子 ,进入细胞核与抗真菌肽基因启动子区的 κ B 样序列结合 ,从而调控下游抗真菌肽基因的表达。

在 Imd 途径中起调控作用的转录因子是 Relish ,它包括一个 N 端 Rel 区和一个 C 端 I κ B 相似区 ,中间含有核定位信号。受到革兰氏阴性菌感染后 ,在 DREDD 等的作用下 ,IKK 复合体(I κ B kinase complex)的磷酸化作用 ,裂解 Relish C 端的抑制区 ,使 Rel 同源区域解离出来 ,并易位到细胞核与 κ B 样序列结合 ,调控下游抗细菌肽基因的表达。

在黑腹果蝇中上述 7 种抗微生物小肽(不包括 Andropin)基因的表达受到 Toll 和 Imd 2 种信号传导途径的调控 ,可分为 4 种情况 :① Drosomycin 主要

由 Toll 途径调控 ;② Diptericin 和 Drosocin 的表达主要由 Imd 途径控制 ;③ Cecropin、Attacin 和 Defensin 基因 ,则需要由 Toll 和 Imd 2 个途径参与 ;④ Metchnikowin 可由上述 2 个途径中的任意 1 个途径就可独立控制其表达(Khush *et al.* , 2001 ;段云等 , 2004)。

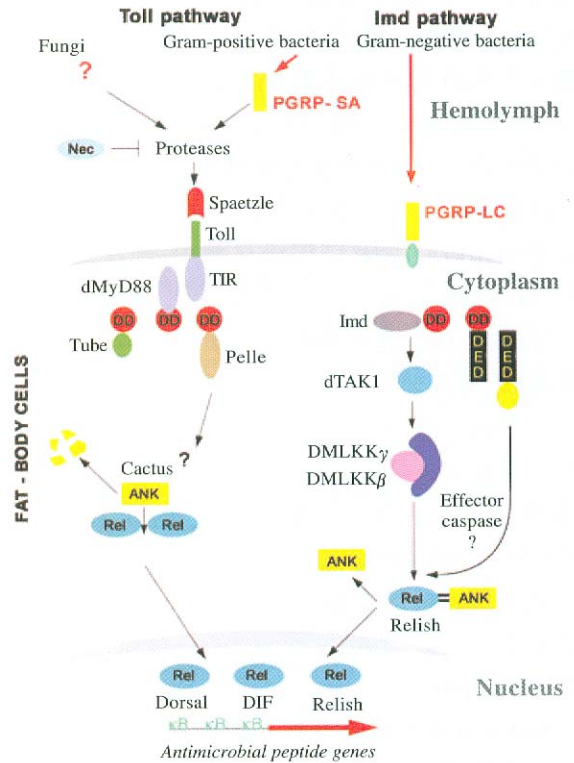


图 3 黑腹果蝇抗微生物肽基因激活表达的信号传导途径(引自 Tzou 等 , 2002b)

Fig. 3 The signal transduction pathway of the genes expression of antimicrobial peptide in *Drosophila melanogaster* (from Tzou *et al.* , 2002b)

3.4 表达谱

果蝇的所有抗微生物肽主要在脂肪体(相当于哺乳动物的肝脏)中表达 ,然后分泌到血淋巴中。抗微生物的表达多为诱导型 , Drosomycin 有基础性表达 ,在受到感染后可加强其表达(Fehlbaum *et al.* , 1994) ,各种抗微生物肽的表达部位见图 4。值得一提的是 ,同一类抗微生物肽的各同系物成员 ,表达模式可以不同 ,如 Cecropin A/B/C 在不同的发育阶段表达有差异 ,同一抗微生物肽的基因 ,在不同部位表达可能有不同的信号传递途径 ,如 Drosomycin 在气管中的表达却是通过 Imd/Relish 途径调控的(Ferrandon *et al.* , 1998)。

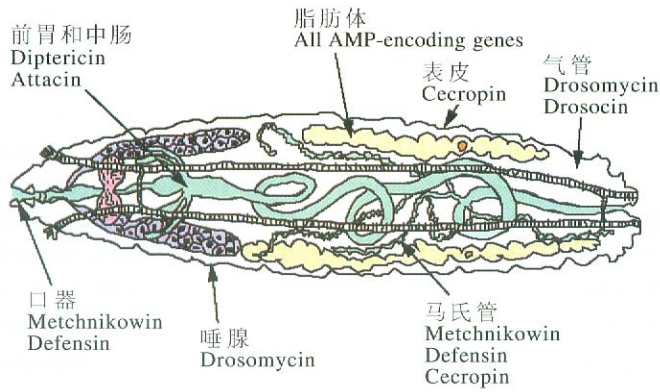


图 4 黑腹果蝇抗微生物肽的表达部位(引自 Tzou 等 2002a)

Fig. 4 The expression pattern of all antimicrobial peptides in *Drosophila melanogaster* (from Tzou *et al.*, 2002a)

4 问题与展望

在昆虫的先天免疫研究中,虽然目前已鉴定发现了 200 多种昆虫抗微生物肽及其同系物基因序列 (Lamberty *et al.*, 2001),对多种抗微生物肽的分子结构与功能的关系、分子进化、抗菌机制有一定的了解,但是仍然有许多问题不清楚甚至研究很少。例如,对存在同一昆虫基因组中的抗微生物肽同系物基因之间的抗性差异和诱导表达差异的调控机制报道较少。大尺度范围内阐明昆虫抗微生物肽的进化机制以及与其他动物抗菌肽和植物防御素之间的进化关系,虽然是目前的研究热点之一,但还没有比较明晰的结果。

果蝇作为一种模式昆虫,有关它的抗微生物肽及其先天免疫的认识,为研究其他昆虫、特别是作为主要农林害虫的鳞翅目昆虫的先天免疫机制发挥了重要的作用。随着果蝇基因组测序的完成和研究新技术的出现,近几年有关昆虫先天免疫的信号识别和传导途径的认识,几乎都是来源与对果蝇抗微生物肽的研究结果,不断有新的果蝇免疫基因得到分离和鉴定,如 Toll 途径和 Imd 途径中的模式识别受体 PGRP 和 GGBP 等识别分子。研究表明,果蝇和哺乳动物有着相似的参与免疫反应的受体和信号转导途径,可以利用果蝇作为研究哺乳动物免疫反应的模型,揭示人类的免疫反应与相关疾病产生的原因。

参 考 文 献 (References)

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, 2000. The *Drosophila* genome review: The

genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(24):2 185 – 2 195.

Boman HG, Faye I, von Hofsten P, Kockum K, Lee JY, Xanthopoulos KG, Bennich H, Engstrom A, Merrifield RB, Andreu D, 1985. On the primary structures of lysozyme, cecropins and attacins from *Hyalophora cecropia*. *Developmental and Comparative Immunology*, 9(3): 551 – 558.

Bulet P, Dimarcq J, Hetru C, Lagueux M, Charlet M, Hegy G, van Dorsselaer A, Hoffmann JA, 1993. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem.*, 268: 14 893 – 14 897.

Bulet P, Hegy G, Lambert J, van Dorsselaer A, Hoffmann JA, Hetru C, 1995. Insect immunity: The inducible antibacterial peptide diptericin carries two O-glycans necessary for biological activity. *Biochemistry*, 34(22): 7 394 – 7 400.

Bulet P, Uurge L, Ohresser S, Hetru C, Otvos LJr, 1996. Enlarged scale chemical synthesis and range of activity of drosocin, an O-glycosylated antibacterial peptide of *Drosophila*. *Eur. J. Biochem.*, 238(1): 64 – 69.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq J, Hoffmann D, 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 23: 329 – 344.

Cao Y, Xiao YC, Wen SY, Zhong YJ, Huang YD, Zhuang CX, Wei JB, Feng PF, Zhang Q, Yang WY, Liu JP, Deng XJ, Wang Y, Zeng JX, Ye KK, Zeng L, Duan Y, Sang YX, Liang H, Shi YM, 2003a. GenBank: *Drs-1C*(AY225091).

Cao Y, Xiao YC, Wen SY, Huang YD, Zhuang CX, Zhong YJ, Yang WY, Deng XJ, Sang YX, Liu JP, Feng PF, Ye KK, 2003b. GenBank: *Drs-1D*(AY351397).

Cao Y, Xiao YC, Huang YD, Deng XJ, Zhuang CX, Yang WY, Zhong YJ, Sang YX, Wen SY, Liu JP, Wei JB, Feng PF, Ye KK, Zeng L, Duan Y, 2003c. GenBank: *Drs-1E*(AY351398).

Cao Y, Xiao YC, Yang WY, Deng XJ, Zhuang CX, Sang YX, Huang YD, Zhong YJ, Liu JP, Wen SY, Ye KK, Feng PF, Zeng L, Duan Y, Wei JB, 2003d. GenBank: *Drs-1F*(AY351399).

Cao Y, Xiao YC, Deng XJ, Sang YX, Zhuang CX, Wen SY, Huang YD,

- Zhong YJ, Liu JP, Yang WY, Feng PF, Wei JB, Ye KK, Zeng L, Duan Y, 2003e. GenBank : *Drs-lq* (AY351400).
- Cao Y, Xiao YC, Liu JP, Huang YD, Zhuang CX, Deng XJ, Yang WY, Sang YX, Zhong YJ, Wen SY, Feng PF, Ye KK, Wei JB, Duan Y, Zeng L, 2003f. GenBank : *Drs-lk* (AY351402).
- Carlsson A, Engstrom P, Palva ET, Bennich H, 1991. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with *omp* gene transcription. *Infect. Immun.*, 59 : 3 040 – 3 045.
- Cavallarin L, Andreu D, San Segundo B, 1998. Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11 : 218 – 227.
- Charlet M, Lagueux M, Reichhart JM, Hoffmann D, Braun A, Meister M, 1996. Cloning of the gene encoding the antibacterial peptide drosocin involved in *Drosophila* immunity. *Eur. J. Biochem.*, 241(3) : 699 – 706.
- Clark AG, Wang L, 1997. Molecular population genetics of *Drosophila* immune system genes. *Genetics*, 147 : 713 – 724.
- Cociancich S, Ghazi A, Heru C, Hoffmann JA, Letellier L, 1993. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.*, 268 : 19 239 – 19 245.
- Daibo S, Kimura M, Goto SG, 2001. Upregulation of genes belonging to the drosomycin family in diapausing adults of *Drosophila triauraria*. *Gene*, 278 : 177 – 184.
- Date A, Satta Y, Takahata N, Shigusa SI, 1998. Evolutionary history and mechanism of the *Drosophila cecropin* gene family. *Immunogenetics*, 47 : 417 – 429.
- Date A, Kasahara K, Sawai H, Chigusa SI, 2002. Rapid evolution of the male-specific antibacterial protein *andropin* gene in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, 54 : 665 – 670.
- Dimarcq JL, Hoffmann D, Meister M, Bulet P, Lanot R, Reichhart JM, Hoffmann JA, 1994. Characterization and transcriptional profile of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *Eur. J. Biochem.*, 221(1) : 201 – 209.
- Duan Y, Wen SY, Deng XJ, Yang WY, Ye MQ, Cao Y, 2004. Innate immunity of *Drosophila*. *Immunological Journal*, 20(Suppl.) : 24 – 27. [段云, 温硕洋, 邓小娟, 杨婉莹, 叶明强, 曹阳, 2004. 果蝇的天然免疫. 免疫学杂志, 20(增刊) : 24 – 27]
- Duda TFJR, Vanhoye D, Nicolas P, 2002. Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides. *Mol. Biol. Evol.*, 19 : 858 – 864.
- Durell SR, Raghunathan G, Guy HR, 1992. Modeling the ion channel structure of cecropin. *Biophys. J.*, 63(6) : 1 623 – 1 631.
- Dushay MS, Roethele JB, Chaverri JM, Dulek DE, Syed SK, Kitami T, Eldon ED, 2000. Two attacin antibacterial genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 246 : 49 – 57.
- Ekengren S, Hultmark D, 1999. *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(11) : 965 – 972.
- Fehlbaum P, Bulet P, Michaut L, Lagueux M, Broekaert WF, Hetru C, Hoffmann JA, 1994. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.*, 269(52) : 33 159 – 33 163.
- Ferrandon D, Jung AC, Criquei M, Lemaitre B, Uttenweiler-Joseph S, Michaut L, Reichhart J, Hoffmann JA, 1998. A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO J.*, 17(5) : 1 217 – 1 227.
- Jiggins JM, Kim KW, 2005. The evolution of antifungal peptides in *Drosophila*. *Genetics*, 171 : 1 847 – 1 859.
- Hedengren M, Asling B, Dushay MS, Ando I, Ekengren S, Wihlborg M, Hultmark D, 1999. Relish, a central factor in the antifungal but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol. Cell*, 4(5) : 827 – 837.
- Hedengren M, Borge K, Hultmark D, 2000. Expression and evolution of the *Drosophila* attacin/diptericin gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 279(2) : 574 – 581.
- Hetru C, Hoffmann D, Bulet P, 1998. Antimicrobial peptides from insects. In : Brey PT, Hultmark D eds. *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman & Hall. 40 – 66.
- Hoffmann JA, 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426 : 33 – 38.
- Hultmark D, Engström A, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG, 1983. Insect immunity : Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.*, 2 : 571 – 576.
- Kadalayil L, Pietersen UM, Engstrom Y, 1997. Adjacent GATA and κ B-like motifs regulate the expression of a *Drosophila* immune gene. *Nucleic Acid Res.*, 25 : 1 233 – 1 239.
- Khush RS, Lemaitre B, 2000. Genes that fight infection : What the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends in Genetics*, 16(10) : 442 – 449.
- Khush RS, Leulier F, Lemaitre B, 2001. *Drosophila* immunity : two paths to NF- κ B. *Trends in Immunology*, 22(5) : 260 – 264.
- Kylsten P, Samakovlis C, Hultmark D, 1990. The cecropin locus in *Drosophila* : a compact gene cluster involved in the response to infection. *EMBO J.*, 9(1) : 217 – 224.
- Lamberty M, Zachary D, Lanot R, Bordereau C, Robert A, Hoffmann JA, Bulet P, 2001. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *J. Biol. Chem.*, 276(6) : 4 085 – 4 092.
- Landon C, Sodano P, Hetru C, Hoffmann J, Ptak M, 1997. Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. *Protein Science*, 6(9) : 1 878 – 1 884.
- Lazzaro BP, Clark AG, 2001. Evidence for recurrent paralogous gene conversion and exceptional allelic divergence in the *attacin* genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 159 : 659 – 671.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA, 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6) : 973 – 983.
- Lemaitre B, Reichhart J, Reichhart J, 1997. *Drosophila* host defense : differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(26) : 14 614 – 14 619.
- Levashina EA, Ohresser S, Bulet P, Reichhart JM, Hetru C, Hoffmann JA, 1995. Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide

- from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur. J. Biochem.*, 233(2):694–700.
- Lucca AJ, Bland JM, 1997. Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, 41(2):481–483.
- Lynch M, Conery JS, 2000. The evolutionary fate and consequence of duplicate genes. *Science*, 290:1151–1155.
- Lynn DJ, Lloyd AT, Fares MA, O'Farrelly C, 2004. Evidence of positively selected sites in mammalian alpha-defensins. *Molecular Biology and Evolution*, 21:819–827.
- Manfruelli P, Reichhart JM, Steward R, Hoffmann JA, Lemaitre B, 1999. A mosaic analysis in *Drosophila* fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and Dif. *EMBO J.*, 18:3380–3391.
- McManus A, Otvos LJr, Hoffmann R, Craik DJ, 1999. Conformational studies by NMR of the anti-microbial peptide, drosocin and its non-glycosylated derivative: effects of glycosylation on solution conformation. *Biochemistry*, 38:705–714.
- Meng XJ, Khanuja BS, Ip YT, 1999. Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF-kappaB factor. *Genes Dev.*, 13:792–797.
- Michaut L, Fehlbaum P, Moniatte M, Dorselaer AV, Reichhart JM, Bulet P, 1996. Determination of the disulfide array of the first inducible antifungal peptide from insects: drosomycin from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*, 395:6–10.
- Morrison GM, Semple CAM, Kilanowski FM, Hill RE, Dorin JR, 2003. Signal sequence conservation and mature peptide divergence within subgroups of the murine beta-defensin gene family. *Molecular Biology and Evolution*, 20:460–470.
- Otvos LJr, 2000. Antibacterial peptide isolated from insects. *J. Peptide Science*, 6:497–511.
- Otvos LJr, 2002. The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59:1138–1150.
- Quesada H, Ramos-Onsins SE, Aguade M, 2005. Birth-and-death evolution of the cecropin multigene family in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, 60:1–11.
- Ramos-Onsins S, Aguade M, 1998. Molecular evolution of the cecropin multigene family in *Drosophila*: functional genes vs pseudogenes. *Genetics*, 150:157–171.
- Samakovlis C, Kylsten P, Kimbrell DA, Engstrom A, Hultmark D, 1991. The andropin gene and its product, a male specific peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.*, 10:163–169.
- Selsted ME, Ouellette AJ, 1995. Defensin in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends Cell Biol.*, 5:114–119.
- Semple CAM, Rolfe M, Dorin JR, 2003. Duplication and selection in the evolution of primate β -defensin genes. *Genome Biology*, 4(5):R31.
- Sun SC, Lindstrom I, Lee JY, Faye I, 1991. Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*, 196:247–254.
- Sun SC, Faye I, 1992. Cecropia immunoresponsive factor, an insect immunoresponsive factor with DNA-binding properties similar to nuclear-factor κ B. *Eur. J. Biochem.*, 204:885–892.
- Tu YZ, Cai MY, Qu XM, 1997. The development of transcription regulating of insects antibacterial polypeptide. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 24(1):22–26. [屠益增, 蔡敏莺, 屈贤铭, 1997. 昆虫抗菌蛋白基因转录调控研究的新进展. 生物化学与生物物理进展, 24(1):22–26]
- Tzou P, Gregorio ED, Lemaitre B, 2002a. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 5:102–110.
- Tzou P, Gregorio ED, Lemaitre B, 2002b. <http://www.cnrs-gif.fr/cgm/immunity/enindex.html#publications>.
- White SH, Wimley WC, Selsted ME, 1995. Structure, function, and membrane integration of defensins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5:521–527.
- Winans KA, King DS, Rao VK, Bertozzi CR, 1999. A chemically synthesized version of the insect antibacterial glycopeptide, dipterocin, disrupts bacterial membrane integrity. *Biochemistry*, 38:11700–11710.
- Xiao YC, Wen SY, Huang YD, Yang WY, Cao Y, 2004. The relationships between the structure and function of insect antibacterial peptides and antifungal peptides and molecular design. *Acta Entomol. Sin.*, 47(5):659–669. [肖业臣, 温硕洋, 黄亚东, 杨婉莹, 曹阳, 2004. 昆虫抗菌肽和抗菌肽结构与功能的关系及分子设计. 昆虫学报, 47(5):659–669]
- Yang WY, Wen SY, Huang YD, Ye MQ, Deng XJ, Han D, Xia QY, Cao Y, 2006. Functional divergence of six isoforms of antifungal peptide drosomycin in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 379:26–32.

(责任编辑：黄玲巧)